All' Illustre S. Prof. G. Fo...
con somma reverenza
l'A.

I MEZZI DI DIFESA DELL'ORGANISMO

DI FRONTE AI BLASTOMICETI

RICERCHE

del Dott. **GIUSEPPE JONA**

Medico Secondario - incaricato della direzione

Jm 1S

Estratto dal Periodico **Rivista Veneta di Scienze Mediche**
Anno XIII - Fasc. X e XII° del 1896

VENEZIA
TIP. ANTICA DITTA CORDELLA
1896

I MEZZI DI DIFESA DELL'ORGANISMO

DI FRONTE AI BLASTOMICETI

RICERCHE

del Dott. **GIUSEPPE JONA**

Medico Secondario - incaricato della direzione

Estratto dal Periodico **Rivista Veneta di Scienze Mediche**
Anno XIII - Fasc. X e XII° del 1896

VENEZIA
TIP. ANTICA DITTA CORDELLA
1896

Gabinetto Batteriologico dell' Ospedale Civile di Venezia

I mezzi di difesa dell'organismo di fronte ai blastomiceti

Ricerche del Dott. Giuseppe Jona

Medico Secondario - incaricato della direzione

L' importanza dei blastomiceti nella patologia animale venne riconosciuta solo da poco tempo. — Dopo che Pasteur ebbe dimostrato la natura vitale del fenomeno della fermentazione, ed il significato delle cellule del fermento, vi furono bensì ricercatori, quali Grohè, Popoff, Roussy, Grohmann (1), ecc., i quali studiarono l' azione dei fermenti introdotti per varie vie negli animali, e descrissero quadri morbosi svariati, ma le loro ricerche erano viziate nel fondamento, in quanto che i fermenti venivano adoperati tal quali si usano nell' industria, carichi dunque non solo di varietà numerose di blastomiceti, ma ben anco di batterii innumerevoli.

Neumeyer e Raum furono i primi ad intraprendere questi studi, adoperando colture pure di blastomiceti. Neumeyer (2) introdusse i blastomiceti nei conigli per via ipodermica, e pel tubo digerente; e non potè osservare fenomeni patologici degni di nota. — Raum (3) iniettò in circolo ai conigli parecchie varietà di blastomiceti. Ri-

(1) Citati da Neumeyer e da Raum.

(2) *Neumeyer* Untersuchungen üb. die Wirkung d. Hefearten auf den tierischen u. menschlichen Organismus; München 1890.

(3) *Raum* Zur Morphologie u. Biologie der Sprosspitze; Zeitschrift für Hygiene 1891, B. X. H. 1.

scontrò che alcune danno soltanto un innalzamento febbrile della temperatura, affatto passeggiero, altre provocano tosto fenomeni dispnoici, accompagnati da ipotermia, e terminanti per lo più con un collasso mortale.

La prima osservazione importante, nella patologia umana fu quella di Busse, (1) il quale in un caso di pioemia dimostrò e interpretò quale elemento eziologico, un numero straordinariamente grande di blastomiceti. Questo caso era stato daprima da lui descritto quale sarcoma periosteale della tibia; la sezione condotta qualche tempo dopo, gli fece mutare questo giudizio in quello di ascesso periosteale, da cui sarebbe partita l' infezione e la formazione di innumerevoli focolai ascessuali nei visceri; Sanfelice però dalla descrizione del Busse, ritiene che veramente si trattasse di una sarcomatosi molle, diffusa.

A Sanfelice, spetta indubbiamente il merito d' aver dato a questi studi un indirizzo originale e vigoroso.

Dopo aver isolato dalle frutta acide, numerose varietà di blastomiceti, egli li studiò nei loro caratteri morfologici e colturali (2) poi rispetto al loro potere patogeno su conigli, cani, cavie, galline ecc. (3) e ne descrisse in modo particolare una forma della quale dimostrò un potere patogeno di nuova e singolare importanza e cioè il *saccaromyces neoformans*, capace di produrre nelle cavie, conigli, cani delle neoplasie multiple, diffuse, di carattere istologico non bene determinato e che nel bargiglio di un gallo produsse una neoplasia di carattere strettamente epiteliare.

Poco dopo i primi studi di Sanfelice sui blastomiceti patogeni, Maffucci e Sirleo (4) da una cavia morta spontaneamente per neoplasie diffuse dei polmoni, isolarono un blastomiceta il quale si dimostrò capace di riprodurre nelle cavie fatti di *neoproduzione* di indole cronica i cui prodotti cellulari migrano dal punto della neoformazione

(1) Busse: Centralblatt f. Bakeriologie; 1894 vol XVI p. 175 Arch. di Virchow 1895, vol. CX pag. 23.

(2) Sanfelice; Annali dell' Istituto d' Igiene della R. Università di Roma vol. IV 1894; pag. 463.

(3) Sanfelice - Ann. dell' Istit. d' Igiene di Roma; 1895 p. 239; 1896 p. 133 Zeitschrift für Hygiene; 1896, B. XXII; H. 1.

(4) Maffucci e Sirleo - Il Policlinico Vol. II C. pag. 138; id. ibid. pag. 245.

alle ghiandole linfatiche; e nei conigli danno neoplasie diffuse dei visceri, non molto dissimili da nodi cancerigni.

Il Sanfelice nel mentre studiava le alterazioni che il *saccaromyces neoformans* produce nei vari organi e tessuti, adottava per esso una colorazione che poteva dimostrare specifica, e affermava la perfetta identità morfologica tra l' aspetto assunto dai blastomiceti nei tessuti, e le forme descritte in passato come corpuscoli a fucsina dal Russel e come coccidii da numerosi autori. In seguito a tali vedute, venivano pubblicate da più parti ricerche che possono dividersi in due categorie: le une mirarono soltanto a dimostrare per mezzo delle colorazioni specifiche, la presenza del nuovo elemento nelle sezioni di tumori sarcomatosi e cancerigni, le altre intesero anche ad isolare dai tumori l' elemento parassitario, ed a riprodurre con esso la forma morbosa.

Alla prima categoria spettano le ricerche di Roncalli (1) che studiò sotto questo punto di vista alcuni sarcomi e adeno-carcinomi dell' ovaio; di Ajevoli (2) che riscontrò numerose forme parassitarie in un cancro della mammella; di Rossi-Doria (3) che li dimostrò nel deciduoma maligno, e ultimamente di Binaghi (4) che dichiarò di averli constatati in 40 su 53 epiteliomi esaminati.

Alla seconda categoria spettano i casi di Sanfelice (5) che isolò blastomiceti da epiteliomi del labbro e dell' utero e che da un epitelioma del fegato di un bove, isolò un saccaromyces da lui detto lythogenes, interessante non solo per le lesioni anatomo-patologiche che produce negli animali da esperimento, ma anche per la maniera con cui degenera nei tessuti, producendo delle masse calcaree; di Kahane (6) che isolò un saccaromyces da un epitelioma dell' utero, di Curtis (7) (da un mixosarcoma del femore) di Corselli e Frisco (8) (da un linfosarcoma del mesentere) di Roncalli (9) che recentemente

(1) Policlinico; vol. II C. 1895 Cblatt f. Bakteriol. 1895.
(2) Policlinico, volume II, C.
(3) Policlinico; vol. III, C. 1896.
(4) Policlinico; vol. III C. 1896 p. 416.
(5) Cblatt f Bakteriol; 1895, vol. XVIII p. 368.
(6) Presse Médicale 1895; 28-9, Annali di Pasteur 1896 n. 9.
(7) Ann. dell' Istituto d' Igiene 1895.
(8) Cblatt f. Bakteriol. 18.
(9) Policlinico vol. III; C 1896; p. 438

isolò da un epitelioma della lingua, e dalle ghiandole linfatiche infette secondariamente ad un sarcoma mammario, un blastomiceta corrispondente pressochè in tutto al saccaromyces lythogenes di Sanfelice.

Finalmente accanto alle ricerche di Busse che attribuì ai blastomiceti la proprietà di indurre una pioemia, di Sanfelice e suoi seguaci, che li ritengono atti a produrre le neoplasie maligne — recentemente Memmo (1) dell' istituto di igiene dell' Università di Roma, sostenne che anche la rabbia è di origine blastomicetica, e che un blastomiceta da lui isolato una volta dal midollo di un coniglio morto di rabbia sperimentale, e una seconda volta dal cervello di un bambino, morto per virus di strada, potè riprodurre nei conigli la rabbia paralitica.

La massa di osservazioni che noi abbiamo riferito fin qui, non andò certo esente da obiezioni e da critiche; ma ancorchè si voglia riserbare il proprio giudizio sul complesso dei fatti e delle interpretazioni, apparisce indubbio che i blastomiceti sono destinati ad occupare nell' etiologia dei morbi un posto di inattesa importanza.

Le ricerche sperimentali condotte finora dagli Autori, (e sopratutto da Sanfelice e da Maffucci e Sirleo) hanno mirato naturalmente (come le prime in questo indirizzo) a studiare le modificazioni strettamente patologiche, che i blastomiceti determinano nei tessuti dell'organismo infettato. Meno intimamente invece furono studiate sino ad ora le modificazioni di natura, per dir così, protettiva, che l' organismo stesso presenta quale reazione di difesa verso l' agente infettante. Tale invece è il problema che mi sono proposto, e che colle presenti ricerche ho cercato di risolvere per una singola forma di infezione blastomicetica. — A giustificare il problema che mi son posto, ricordo anzitutto che i blastomiceti, fattori di fenomeni così grandiosi e vasti, quale quelli delle fermentazioni, son diffusi in natura per modo, da doversi trovare frequentemente a contatto con la superficie del corpo animale, da esser non di rado pronti a penetrare nell' interno dell' organismo, non appena le barriere normalmente poste vengano ad esser lese; ricordiamo che mentre questo indirizzo di ricerche è ancor giovanissimo, tuttavia già il Bossi e il

(1) Memmo; Cblatt. f. Bakteriol; 1896, B XX; H.

Rossi Doria hanno trovato i blastomiceti nell' endometrio e nelle secrezioni vaginali e di là riuscirono ad isolarne parecchie forme.

In secondo luogo l' analogia con quanto fu fatto, e si sa delle infezioni da schizomiceti rende più che mai legittimo il problema.

Ognuno sa infatti che nelle infezioni batteriche, l' animale mette costantemente in azione certi meccanismi di difesa, per mezzo dei quali lotta contro l' agente esterno. Questa lotta sussiste, qualunque ne debba esser l' esito, anzi è tanto più viva quanto più profondo è lo stato morboso determinato dall' infezione: anche quando essa finisce colla morte dell' animale, la lotta sussiste fino all' ultimo e certi fenomeni morbosi stessi non vengono interpretati che come espressione di questa lotta o come meccanismi di difesa.

In fondo adunque nello studio che mi sono proposto l' oggetto della ricerca non è essenzialmente diverso da quello degli studi precedenti, ma è diverso piuttosto il metodo della ricerca.

Così p. es. mentre verso un dato animale, a chi studia l' azione patogena del blastomiceta, basta constatare che l' animale non presenta fenomeni morbosi, o li presenta lievissimi, e che ucciso l' animale anche a diversa distanza di tempo dall' inoculazione i suoi organi non presentano modificazioni patologiche, a me invece preme seguire minutamente l' andamento dei fenomeni nei primi momenti dall' inoculazione e il modo con cui l' organismo si è liberato dal parassita. Mentre il primo si occupa di vedere come l' organismo reagisce al blastomiceta ammalando io voglio ricercare come reagisce nel liberarsene.

Se dobbiamo giudicare da quanto avviene per gli schizomiceti, dobbiamo ritenere che anche qui i meccanismi di difesa saranno varii a seconda dell' infezione, e a seconda dell' animale infettato.

Ciò che protegge l' organismo animale contro gli schizomiceti ora è la reazione chimica del sangue, ora sono certe proprietà fisiologiche di esso, ora è l' azione fagocitaria, ora è una insensibilità speciale dei tessuti, ecc.. Sarà altrettanto per i blastomiceti?

Dovendo iniziare tali ricerche è indifferente partire da un blastomiceta patogeno o non patogeno. Nel primo caso però l' ordine dei fenomeni da studiarsi sarebbe duplice, e cioè da un lato i fenomeni puramente reattivi, dall' altra i fenomeni patologici. Perciò, in un primo studio, ho preferito, come più semplice, la seconda via.

— Ed ho studiato l' azione di un blastomiceta che ho isolato dall' aria, sopra i conigli, pei quali ordinariamente non è patogeno, sia che lo si introduca nel sangue, o sotto pelle, od entro il peritoneo. — So bene che le conclusioni non valgono che per l' infezione studiata, valgono cioè per quel blastomiceta in quell' animale. Tuttavia, alcune delle conclusioni fondandosi sopra proprietà generali, credo che esse potranno acquistare in seguito un significato più largo nel meccanismo generale di protezione.

I.

Il blastomiceta da me studiato si sviluppò accidentalmente sopra una piastra d' agar rimasta esposta per poco all' aria. Formava una grossa colonia, rotonda, oscura al centro, di aspetto più chiaro e zigrinato alla periferia, e che già a debole ingrandimento si riconosceva costituita da grossi elementi ovali, a contorni ben netti.

Trapiantato sopra un tubetto d' agar, mi fu facile ottenerne lo sviluppo in questo e in altri mezzi nutrizi. Per la sua proprietà di fondere la gelatina, unita al volume ragguardevole degli elementi, questo blastomiceta rientra nel 5° gruppo della classificazione proposta da Sanfelice, per la sua forma può considerarsi come il saccaromyces apiculatus di Hansen. Siccome però se ne differenzia per alcuni caratteri di sviluppo, credo non inutile dare una descrizione, per quanto è possibile, completa delle sue proprietà ; tanto più che la necessità di esatte descrizioni così morfologiche che colturali, delle numerose varietà di fermenti venne apertamente riconosciuta da chi con maggior ardore si occupa di questi studi.

Il saccaromyces apiculatus, tratto da colture recenti di 3 a 8 giorni, è rappresentato da elementi ovalari, aventi un diametro massimo variante da 5 a 16 micri (Fig. I). — Le forme più piccole sono pressochè rotonde, le adulte schiettamente elittiche, le maggiori hanno per lo più un leggero strozzamento centrale. La maggior parte degli elementi ha un solo contorno, fortemente rifrangente la luce, un contenuto leggermente verdiccio, il quale però non occupa completamente tutto l' elemento, anzi è talora ridotto ad un semplice alone, e a leggieri tramezzi che traversano in varii sensi l' elemento, e tra cui restano compresi degli spazi di una tinta grigio-rosea, per lo più leggierissima, appena accennata. Questi spazi ora sono piccoli e

multipli, ora in numero scarso, p. es. di due, occupanti col loro volume quasi tutto l'elemento. Sul significato di essa non è mio compito entrare. — Assai spesso, non però costantemente, le singole cellule blastomicetiche presentano ad uno dei poli una lievissima sporgenza che dà al contorno un aspetto acuminato (apiculum). Non di rado questo aspetto è assunto dall'elemento ad ambedue i poli.

Numerosissimi elementi sono in via di riproduzione, che avviene per gemmazione; un elemento presenta da una a cinque, sei gemme, le quali si partono dai poli della cellula madre, formando talora in corrispondenza ad essi delle vere coroncine di elementi figli.

In alcune colture, anche recenti, gli elementi prendono un aspetto alquanto diverso, e cioè prevalgono le forme rotonde, a contorno rifrangente, a contenuto ora omogeneo, ora granuloso, ora cogli spazii rosei anzidescritti, e la riproduzione, anzichè per gemmazione, avviene per scissione e cioè nell'elemento adulto si veggono disegnarsi uno o due solchi che divengono più profondi, fino a dividere l'elemento in 2, 3 e talora 4 parti.

Non saprei dire quali sieno le condizioni che determinano queste diversità di aspetto; talora le due forme si trovano commiste in una stessa coltura.

Allorchè i blastomiceti si traggono da una coltura di 15 a 20 giorni, si trovano quà e là degli elementi di forma piuttosto irregolare, il cui contorno è meno rifrangente e presenta talora delle soluzioni di continuo, delle vere lacerazioni, mentre il contenuto è reso assai più trasparente, talora leggermente granuloso; e in complesso l'elemento si presenta come degenerato, in via di dissoluzione.

In colture vecchie di 70 a 80 giorni, prevalgono di gran lunga le forme a doppio contorno, e in alcune, i due contorni sono così distanti, da lasciare tra loro un notevole alone di aspetto jalino acquistando allora un aspetto assai simile a quello che i blastomiceti prendono nei tessuti. Le forme a doppio contorno presentano spesso delle gemmazioni, pur esse a due contorni, ognuno dei quali si continua col corrispondente della cellula madre. Vi si vedono varie forme di unione di 3, 4 elementi, entro un contorno esterno, che apparisce come una capsula comune.

Inoltre si osservano forme, (e sembrano le più vecchie) grandi,

vescicolose, con contorno ancora ben rifrangente la luce, un contenuto tutto jalino, e al centro un piccolo ammasso di granuli.

Il saccaromyces apiculatus si sviluppa su tutti i comuni mezzi di nutrizione.

Nel brodo semplice, nel brodo glucosato ha uno sviluppo lento e scarso che precipita al fondo, sotto forma di un deposito bianchiccio, mentre il liquido soprastante resta perfettamente limpido.

Si sviluppa bene nei mezzi liquidi zuccherati, e nel mosto artificiale, composto secondo la formula di Cuboni e Pizzigoni:

Acqua di f.	1000
Zucchero	100
Solfato di magnesio	8
Peptone	5
Ac. tartarico	5

Si sviluppa pure entro, certi limiti, nell' acqua distillata. In nessuno dei mezzi liquidi si ha produzione di velo.

Le colture per infissione in gelatina, si sviluppano lentamente producendo fusione del mezzo, fusione che si approfonda a poco a poco, mantenendo un livello parallelo alla superficie.

In piastra di gelatina, le colonie piccole hanno una forma tondeggiante con centro oscure e alone periferico più chiaro zigrinato; quando aumentano di volume, ora conservano lo stesso aspetto, ora invece prendono una forma bizzarra, per numerosi e sottili prolungamenti che non di rado danno alla coltura un aspetto aracniforme. I prolungamenti sono costituiti da pseudo-ifi, cioè da filamenti formati di serie di blastomiceti elegantissimi, tutti eguali, aventi un doppio contorno assai delicato, e contenuto a sottili granulazioni. (Fig. 2). Alla periferia le singole colonie presentano un leggero alone di fusione che va aumentando assai lentamente.

Le due forme di colonie ricordano a quelle delle due varietà descritte da Cuboni e Pizzigoni (1), come saccaromyces elipsoidaeus varietà *A* e *B;* e i caratteri diffenziali tra queste, (caratteri che pur servirono di base a distinguere le due varietà) non

(1) Cuboni e Pizzigoni; Contribuz. allo studio dei fermenti del vino. Stazioni agrarie sperimentali 1893 vol. XXV, fasc. 1, 2.

son maggiori che tra le mie. Potrebbe dunque supporsi che anche le mie colture, contenessero mescolate due varietà di saccaromiceti; nè l' essere partito da un' unica colonia sarebbe risposta sufficiente, in quanto che secondo Hansen una sola colonia può contenere commiste più varietà, e sola garanzia di assoluta purezza sarebbe quella di partire da un unico blastomiceta (Ein-Zell-Cultur). Piuttosto debbo dire che reisolando ora l' una, ora l' altra delle colonie aventi aspetti diversi, non ottenni di dimostrare altri caratteri differenziali, e potei riottenere con ciascuna di esse colonie dell' uno e dell' altro aspetto. Perciò esse non rappresentano che modificazioni di forma, che le colonie assumono per circostanze accidentali di profondità, di rapidità di sviluppo, ecc.

Nell' agar semplice e nell' agar glicerinato il sacc. apiculatus cresce bene sotto forma di coloniette isolate, leggermente rilevate, bianche; quando però lo sviluppo è molto rigoglioso forma una patina uniforme, umida, bianco-rosea.

Nell' agar, per infissione, esso si sviluppa abbondantemente alla superficie, ma si sviluppa pure in profondità, lungo la linea di innesto e con filamenti laterali che fanno rassomigliare grandemente questa coltura a quella del bacillo carbonchioso.

In piastra le colonie prendono lo stesso aspetto che nella piastre di gelatina, ove si eccettui l' alone di fusione periferico.

Nel siero di sangue si sviluppa stentatamente.

In patata, dà uno sviluppo abbondante, sotto forma di una patina di colore maltaceo che si estende abbastanza rapidamente, con un alone periferico bruno, che va poi acquistando colore di malta. — Anche i singoli blastomiceti provenienti dalle patate, hanno acquistato una tinta verdiccia, alquanto più carica.

La reazione del mezzo nutrizio è, sino ad un certo punto, indifferente; cioè il saccar. apiculatus si sviluppa così su terreni neutri, che alcalini ed acidi. questi ultimi però ne favoriscono assai lo sviluppo.

Se si aggiunge all' agar tanto carbonato di soda da ottenere chiara reazione rossa colla carta alla fenolftaleina; il saccaromyces non si sviluppa più; quando la reazione è appena sensibile, già lo sviluppo è lento e tardo.

L' acido lattico, l' acido tartarico, l' acido cloridrico, sono in-

vece tollerati in dose elevatissima; l' aggiunta di 3 goccie di acido cloridrico puro ad una provetta contenente 6 cc. di agar (2 1|2 o|o) non impedì un ricchissimo sviluppo della coltura, sotto forma di una patina abbondante, morbida, bianco-rosea; 2 goccie di una soluzione di acido fenico al 5 0|0 in una provetta di cc. 5 di agar hanno concesso uno sviluppo abbondante, sebbene un po' tardo; quattro goccie fecero rimanere sterile il mezzo.

Il saccaromyces apiculatus si sviluppa bene alla temperatura ambiente; nel termostato a 35 gradi ha uno sviluppo scarsissimo, talora nullo; estraendo però la coltura, anche dopo molti giorni, lo sviluppo si fa presto abbondante. Mantenendolo invece fra 39 e 41 gradi, lo sviluppo è costantemente nullo, non solo, ma bastano 48 o 72 ore di soggiorno a quella temperatura, per impedire ogni ulteriore sviluppo, anche rimettendolo alla temperatura ambiente.

L' influenza della luce è nulla; fatte tre piastre, e lasciata una in completa oscurità, l' altra a luce diffusa, l' altra esposta alla luce diretta con qualche striscia coperta di carta nera, non si potè notare assolutamente alcune diversità nello sviluppo.

Posto a svilupparе in mezzi zuccherati, istituiti secondo le norme date da Sanfelice con gr. 1|2 di peptone e gr. 6 di zucchero per 100 gr. di acqua distillata, esso determina la fermentazione alcoolica col glucosio e col levulosio, non col saccarosio e lattosio.

Il miglior mezzo di esame di questi elementi è come è noto l' esame diretto senza fissazione nè colorazione. La colorazione degli elementi, tratti da colture, fatta sia in una goccia di liquido, sia sopra vetrino lentamente disseccato e fissato coll' alcool ed etere hanno dato i risultati già notati dagli A.; in generale la colorazione non viene assunta dagli spazii jalini che si trovano nell' interno dell' elemento, nè dal sottile alone compreso fra il doppio contorno, epperò questo, colla colorazione, viene messo in evidenza sopra elementi anche più numerosi che nell' esame a fresco.

Dell' aspetto del blastomiceta nei tessuti dirò in seguito.

II.

Ho studiato anzitutto l' infezione ematogena.

Il saccaromyces apiculatus, inoculato in gran copia ai conigli,

direttamente, nel sangue, non produce in essi d' ordinario fenomeni patologici rilevanti.

Sopra tredici animali operati in questa guisa, due morirono spontaneamente nelle prime 48 ore; ma fu possibile in ambo i casi stabilirne in modo evidente la causa, del tutto estranea al materiale inoculato.

Ordinariamente, l' animale continua a dimostrare subito dopo l' inoculazione e nei giorni successivi, perfetto benessere. La temperatura presenta un elevamento di circa un centigrado nelle prime ore, come fu già osservato da Raum in seguito all' iniezione endovenosa di parecchie varietà di blastomiceti; poi ritorna e si mantiene normale. Il peso dell' animale non diminuisce, ed io ho tuttora in vita animali operati da quasi tre mesi, senza ch' essi presentino segno di malattia. — Di rado, e solo nei primi giorni, le orine contengono albumina, ed uccidendo a varia distanza di tempo gli animali inoculati, il solo fatto patologico che si presenta all' esame macroscopico è una lesione, a tratti circoscritti, della sostanza corticale del rene. Del reperto istologico di questo e degli altri organi, i quali non mancano pure di presentare lesioni disseminate e circoscritte, tali che solo l' esame microscopico poteva rivelarle, dirò minutamente in appresso.

Le colture istituite cogli organi interni (come pure dirò particolareggiatamente nel seguito) rimasero costantemente sterili.

Il problema dunque ch' io intesi di pormi era quello di ricercare la via ed il meccanismo con cui gli animali si sono liberati dall' agente introdotto in circolo.

Anzitutto era da chiedere fino a quando, ed in quali proporzioni, i blastomiceti introdotti continuassero a circolare nel sangue e quale azione il sangue circolante producesse sopra di essi.

Ho istituito perciò una prima serie di ricerche, in cui procedevo a questo modo: presa una rigogliosa coltura in agar di blastomiceti, ne stemperavo tutto l' abbondante materiale in 5-6 cent. cub. di acqua sterile, che prendeva tosto un aspetto opaco, lattiginoso: poi, scoperta e isolata la giugulare esterna di un coniglio, vi introducevo lentamente tutto il materiale per mezzo di una siringhetta Banti. — Subito dopo, scoprivo la giugulare del lato opposto e a varia distanza di tempo dall' inoculazione, da pochi minuti ad ore

e a giorni, aspiravo (adoperando pure siringhette Banti) del sangue, che veniva direttamente distribuito in provette di brodo e siero. — La presa di sangue veniva ripetuta cinque, sei volte per ogni caso, ed era sempre abbondante in quanto che in ogni provetta di mezzo nutrizio veniva versato da 1|2 a 1 1|2 cc. di sangue.

Orbene: i risultati ottenuti mi dimostrarono costantemente, che solo per poche ore (otto al massimo) i blastomiceti si mantenevano in circolo.

Nei primi momenti dopo l'inoculazione, il sangue estratto dava luogo a colture rigogliose; poi scarse, cosichè, p. e., in un coniglio operato alle 9 del mattino, dopo 5 ore, 1|2 cc. di sangue posto nell'agar diede sviluppo ad una sola colonia.

Talora il blastomiceta scompariva dal sangue anche più rapidamente; mi avvenne talora di non ottenere sviluppo neppure dopo due ore dall'inoculazione. Colture fatte a distanza di 10, ore, di 24 ore, di giorni rimasero costantemente sterili.

In questi esperimenti, io volli tener conto non solo dello sviluppo presentato dalle singole colture, ma anche dell'epoca in cui lo sviluppo si manifestava. Io potei infatti convincermi che nelle colture istituite col sangue estratto dopo qualche ora, le colonie si sviluppano più tardi che non nelle precedenti; ed in quelle e in queste, notevolmente più tardi rispetto a trapianti di colture comuni; cosicchè, mentre ordinariamente un trapianto in agar presenta segni di sviluppo già dopo 48 ore, invece una coltura del sangue richiede 5-6 e più giorni.

Anche i primi trapianti, delle colture provenienti dal sangue, si sviluppano in ritardo rispetto ai normali.

Nè a ciò si limitano i fatti riguardanti le colture dal sangue.

Ecco, p. es. ciò che ottenni in un caso, in cui il risultato positivo si protrasse insolitamente fino ad otto ore dall'iniezione. Nell'agar, dove avevo versato quasi 1 cc. di sangue, dopo 12 giorni osservai 10 coloniette, piccole, rotonde, rilevate, nereggianti. Esse erano costituite da elementi, i quali si presentavano insolitamente piccoli: avevano cioè un diametro eguale ad 1|3 di quello degli elementi normali; i maggiori non oltrepassavano i 6 micri, mentre nelle comuni colture raggiungono perfino i 16 micri. Oltre che le dimensioni, la struttura degli elementi appariva ben diversa dal nor-

male: anzichè un contenuto verdiccio, diffuso, occupante tutto l' elemento e interrotto solo dai descritti vacuoli jalini, essi presentavano un contenuto affatto trasparente, e nel centro uno, o due blocchetti o sferule verdiccie, ben caratterizzate, che davano assolutamente l' impressione di spore, e pareva venissero a rappresentare il protoplasma ordinariamente diffuso, qui raccolto, condensato per dir così in queste produzioni interne. (Fig. 3) Mancavano invece le forme in gemmazione. Infine — cosa affatto nuova — si vedevano qua e là, in mezzo a questa massa di piccoli elementi — rare formazioni con aspetto di piccoli ifi, contenenti nel loro interno le stesse sferule verdiccie (Fig. 4, 5) — In una parola, la coltura aveva cambiati i suoi caratteri di vero saccaromyces in quelli di un oïdium.

Nel trarre ripetutamente da questa provetta materiale per trapianti e preparati, la coltura venne disseminandosi per tutta la supeficie dell' agar inclinato; e cosi in altri dieci giorni venne a farsi uno sviluppo diffuso e rigoglioso, ma di un aspetto nuovo, sotto forma cioè di croste dure, leggermente sollevate dalla superficie dell' agar, e di un nero intensissimo, cosicchè tutta la superficie dava l' immagine di una carta carbonizzata. — E di mano in mano che progrediva lo sviluppo, sempre più si accentuavano le modificazioni degli elementi, in quanto che andavano prevalendo le forme di veri ifi, lunghi, rigogliosi, intrecciantisi così da costituire veri micelii (Fig. 6); gonidii stavano contenuti nell' interno, ma talora erano apposti lateralmente agli ifi stessi, oppure raggruppati intorno alla loro estremità libera, ma sempre però senza un vero organo intermedio di fluttificazione. — Le forme di elementi ovali, liberi che vi si mantenevano abbondantissime, eguali ai sopradescritti, non venivano più dunque a rappresentare che i gonidii di questa nuova coltura, intermedia tra gli oïdium ed i veri ifomiceti.

Trapianti successivi fino alla terza generazione, hanno sino ad ora mantenuto i nuovi caratteri così macroscopici che microscopici. Ma l' evoluzione della forma, non è a mio avviso, ancora del tutto esaurita.

Credo che a nessuno sfuggirà il notevole significato di questi fenomeni. Intorno al pleomorfismo dei blastomiceti e degli ifomiceti si va stabilendo un nuovo ordine di idee. Anche in alcuni dei la-

vori citati da principio, si parla della produzione di ifi nelle colture di blastomiceti; ma, a quanto mi parve, sempre come fatto isolato, di degenerazione di singoli elementi non intaccante la specificità colturale. Invece un largo contributo di fatti che mirano direttamente al problema del pleomorfismo vi ha portato il Kremer (1), in un lavoro recente sulla produzione di ifomiceti nella sifilide, nel carcinoma e nel sarcoma; e nel campo botanico, un lavoro, pure recente, di Jörgensen (2) sull' origine dei fermenti del vino, conclude che i blastomiceti veri che costituiscono questi fermenti, provengono da muffe e che sono le spore di queste che acquistano e mantengono successivamente il carattere di veri saccaromiceti.

Io non entrerò nel significato generale di tali fenomeni, che acquisteranno certo una grande importanza biologica, e che son destinati probabilmente a portar luce in alcuni problemi della patologia animale. Qui voleva soltanto osservare come questi fatti di pleomorfismo da me constatati, fossero già noti; ma voleva rilevare nel tempo stesso che straordinaria veramente dev' essere l'energia dell'azione esercitata dal sangue circolante, se soltanto otto ore di contatto con esso hanno potuto indurre in questi elementi modificazioni tanto essenziali; modificazioni ch' io non vidi avvenire in dieci mesi di trapianti successivi, di passaggi nei terreni nutrizii più svariati, di sbalzi di temperatura, di luce, di reazione chimica, ecc.

Nè quest' azione viene esercitata soltanto dal sangue circolante. Anche *in vitro,* e da parte così del sangue completo che del plasma, si manifesta un' azione identica, sebbene più lenta.

Lo studio dell' azione del sangue *in vitro*, mi veniva imposto dalle considerazioni che seguono:

Il risultato negativo delle seminagioni del sangue poche ore dopo l' inoculazione, poteva dipendere, o da una dissoluzione degli elementi blastomicetici nel circolo, o dall' essere avvenuta una cessazione delle loro proprietà vitali; o infine dal fatto che essi fossero sfuggiti dal sangue sia rifugiandosi nei tessuti, sia eliminandosi dall' organismo.

Entro certi limiti, la prima ipotesi mi fu dimostrata vera dalla

---

(1) Kremer; Cblatt f. Bakteriologie; 1896, B. XX; H. 2-3.

(2) Jörgensen; Moniteur scientifique; Iuin 1896 p. 438.

constatazione di forme intermedie con chiari segni di avviamento alla dissoluzione, nel fondo delle provette in brodo, disseminate con sangue raccolto parecchie ore dopo l' inoculazione.

Avevo pur cercato di seguire l' andamento del fenomeno in uno stesso animale, esaminando direttamente una goccia di sangue tratta dall' orecchio a varii intervalli di tempo dall' inoculazione; ma fin da principio rinunciai a questa via essendomi convinto, che per la scarsezza degli elemènti, troppo laboriosa e non abbastanza feconda era la ricerca.

Ma oltre a ciò, nel fondo delle provette di brodo sunnominate io constatavo fin dai primi giorni un certo numero di elementi, aventi tuttora aspetto normale, e che tuttavia, ad esami ripetuti a distanza di più giorni non mi si mostravano moltiplicati. Di più le provette in agar contemporaneamente infettate rimanevano sterili. Ciò significava dunque, che nel sangue circolante, forme tuttora perfette hanno perduto la capacità di sviluppo. Prima di riconoscere in ciò una proprietà fisiologica del sangue, dobbiamo ricordare che lo stesso stato febbrile del coniglio potrebbe influire sulla vitalità dei blastomiceti, pel solo fatto fisico della temperatura, che va a raggiungere i 40 gradi. Ma da quanto dicemmo precedentemente, risulta che la temperatura di 40 gradi distrugge la vitalità del blastomiceta, solo dopo di aver influito sopra di esso per tre o quattro giorni. Qui invece il fenomeno apparisce dopo poche ore. — Bisogna dunque pensare ad un' influenza distruttrice del menstruo in cui i blastomiceti vengono a trovarsi; ed è perciò che ho creduto di dover ricorrere all' esperimento *in vitro*, affine di dare una dimostrazione diretta dell' attività, che impropriamente diremo battericida, del sangue sui blastomiceti.

Intorno a questa attività, mi riservo di riferire in un prossimo lavoro; qui dirò solo che essa mi risultò indubbia, e sia da parte del sangue intero che da parte del plasma. — Sperimentando coi metodi in uso pei batterii, vidi p. e. che un sangue fresco, inoculato con una coltura recente di blastomiceti, per modo che una goccia di esso dava sviluppo, subito, a 263 colonia, dopo 1|2 ora dava 43 colonie dopo 2 ore, zero; un plasma che dava subito 2095 colonie, ne pava: 1197 dopo un' ora, 769 dopo 2 1|2 ore, 1 dopo 24 ore. È ben vero che dopo un numero vario di ore, lo sviluppo ordinariamente riap-

parisce; ma questo prova soltanto, o che all' azione del sangue si sono sottratte pochissime forme, le quali nel frattempo hanno proliferato; oppure che si trattava di una perdita di vitalità ancora non definitiva, tale che, esaurita la proprietà del sangue portato fuori dei vasi, venne essa pure a cessare. Queste ipotesi, che mi riservo di discutere altrove, nulla tolgono in ogni modo all' essenza di tale proprietà del sangue.

Se poi le provette di sangue o di plasma, infettate di blastomiceti, si esaminano a distanza di giorni e di settimane, si trova in esse uno sviluppo abbondante, ma tale da dimostrare che si è esercitata anche *in vitro* la singolare azione modificatrice che dimostrammo pel sangue circolante.

Non è più un vero saccaromiceta, ed è anche qualche cosa di più che un oidio: difatti ci troviamo di fronte ad ifi ramificantisi, costituenti veri micelii, con sterigmi portanti all' estremità gruppi di gonidi — senza che ci sieno però, come dicemmo anche sopra, organi intermedii di fruttificazione.

Se poi dalle colture in sangue o in plasma, dopo qualche settimana facciamo dei trapianti in agar, lo sviluppo avviene ugualmente con intensa pigmentazione bruna — sebbene, a dir il vero, non così intensa quanto nelle colture ottenute da blastomiceti, che hanno subita l' azione diretta del sangue circolante.

Riassumendo dunque, i blastomiceti, a contatto col sangue vengono profondamente modificati nelle loro proprietà evolutive, e, successivamente, attaccati nella loro vitalità.

E dal complesso degli esperimenti risulta che dei blastomiceti inoculati nella giugulare, alcuni sono stati disciolti nel circolo stesso, ed altri vi erano tuttora presenti, anche quando le colture si dimostravano sterili. É certo però che questi e quelli, tutto sommato, non rappresentano, che una piccola parte della massa inoculata, troppo evidente, risultando la sproporzione fra i primi e gli ultimi saggi.

Restava dunque a vedersi dove i blastomiceti scomparsi dal sangue circolante fossero migrati.

L' ipotesi che prima si presenta è quella che i blastomiceti fossero stati eliminati coll' orina. Ognuno comprende che l' eliminazione di elementi così voluminosi non potrebbe esser supposta senza una lesione cospicua del rene. — Ma poichè appunto di tale lesione

del rene abbiamo parlato fin da principio, e non di rado constatammo la presenza di albumina nell' orina, ci si imponeva una ricerca accurata su questo indirizzo. — Orbene, l' esame ripetuto e diligentissimo delle orine dei conigli inoculati, fatto su tutte le orine raccolte per più giorni, non ci ha dimostrato che in modo affatto eccezionale la presenza di blastomiceti. — Io ho istituito un gran numero di volte, colture con abbondante quantità di orine, e non riuscii una volta sola ad ottenere sviluppo. Citerò come assolutamente probativo un esempio fra i tanti.

Coniglio 14° : alle 7 del mattino si vuota la vescica per compressione dell' addome, poi si inocula nella giugulare sinistra, la solita abbondante quantità di blastomiceti, stemperati in acqua sterile.

L' animale viene lasciato, libero, sul tavolo di operazione, e sorvegliato ; non emette affatto orine sino alle ore 11 1\|2 in cui (4 1\|2 ore dopo l' inoculazione) viene ucciso per mezzo dei vapori di cloroformio. Si fanno colture dal sangue. Poi dalla vescica si raccolgono sterilmente circa 3 cc. di orina con cui si fanno tre colture ; indi tutto il contenuto di essa, (circa 40 cc.) il quale ha aspetto fortemente torbido per presenza di abbondantissimi fosfati. L' aggiunta di due goccie di acido acetico lo rende trasparente ; lo si lascia depositare, e si esamina il fondo, il quale non rivela assolutamente alcuna forma di blastomiceta.

Le colture dal sangue e dall' orina rimangono sterili. Orbene: in questo caso io sapevo che i blastomiceti non erano più in circolo — sapeva di aver raccolto tutta l' orina che nel frattempo l' animale aveva secreto e mi risultava con assoluta certezza che questa non conteneva blastomiceti ; ammesso pure che ne contenesse, dovevano essere in numero infinitesimo, mentre che, se questa fosse la vera via di eliminazione, essi soli — poichè erano del tutto scomparsi dal circolo — avrebbero bastato a rendere torbidi i 40 cc. di orina eliminati nel frattempo.

L' esame istologico dei reni concorda perfettamente con questi risultati e lo vedremo tosto, dovendo appunto passare allo studio dei visceri.

Si sa da molto tempo, e cioè fino dai primi esperimenti di Lewis e Cunningham nel 1872, di Traube e Gscheidler nel 74, che i batterii inoculati direttamente nel sangue, scompaiono dal circolo

rapidamente, talora perfino in pochi minuti. La causa ne rimase del tutto sconosciuta, fino a che la serie di ricerche, iniziata nel **1886** da Fodor, proseguite poi da Wyssokowitsch, da Nuttal, ecc. e più specialmente da Buchner e dai suoi allievi ebbe dimostrato il potere battericida del sangue *in vitro*. Vi fu allora generale tendenza ad ammettere che questa fosse pure la causa della rapida scomparsa dei batterii dal circolo. Più tardi però gli studi importantissimi di Wyssokowitsch e di Werigo misero in vista un'altra possibilità, e cioè questa, che i batterii inoculati, o parte di essi sfuggano all'azione del sangue circolante, ricoverandosi in seno agli organi, e specialmente nel fegato, nella milza, nel midollo osseo, dove sono destinati a subire un'altra serie di azioni.

Era dunque da ricercare se anche nel caso nostro gli organi avessero ricettato quella parte di blastomiceti che il sangue non aveva distrutto e che l'emuntorio principale dell'organismo non aveva eliminato.

Ho proceduto quindi all'esame degli organi dal punto di vista così batteriologico che istologico. A distanza varia dall'inoculazione, gli animali venivano uccisi con poche inalazioni di cloroformio; subito dopo venivano sezionati colle più scrupolose norme asettiche ed i singoli organi raccolti in altrettanti mortajetti sterili, dove venivano finamente triturati. Il materiale ridotto a poltiglia era in parte inoculato in provette di brodo, in parte deposto, strisciandolo, sopra piastre di agar preparate innanzi.

Ho esaminato così polmoni, milza, fegato, reni, capsule surrenali, midollo osseo. La ricerca venne fatta a 30, a 12, a 8, a 4 ore di distanza dall'inoculazione. Non venne estesa ad una distanza di tempo anche inferiore, perchè in quel caso, la presenza di blastomiceti nel sangue, (che dura appunto lungo 4 o 5 ore in media) avrebbe tolto ogni significato all'eventuale reperto positivo dei visceri.

Il risultato dell'esame colturale, così istituito, fu costante ed identico per tutti i visceri, in quanto che colture e piastre rimasero costantemente sterili. Non altrettanto negativo riuscì l'esame dei tessuti.

I pezzi, fissati nel liquido di Müller od in alcool, vennero trattati in seguito coi metodi descritti da Sanfelice, e cioè o colorati in massa col carminio litico e le sezioni col liquido di Ehrlich, op-

pure colorando le sezioni con una miscela di safranina e verde di malachite, in ambo i casi trattando successivamente le sezioni con una soluzione 1|2 0|0 di acido ossalico e scolorando coll'alcool.

La presenza dei blastomiceti nei varii organi si dimostrò per più giorni consecutivi alla inoculazione, essendo la loro sede quasi esclusivamente nei capillari, e dimostrandosi numerosi più che tutto nei polmoni e nei reni.

I polmoni sono gli organi che più direttamente risentono l'offesa di questi elementi, che essendo introdotti nella giugulare, vanno per la via del piccolo circolo direttamente ai polmoni. Ora sebbene il materiale fosse accuratamente diluito, e benchè si sappia che i capillari dei polmoni nei conigli hanno un'ampiezza relativamente grande, pure elementi grossi tanto da equivalere talora a due, o tre, globuli rossi, e che talvolta si uniscono intimamente a due a tre a quattro, non possono a meno di trovare un grave ostacolo al loro circolare. in questo primo territorio capillare da essi incontrato.

Non solo, ma la massa penetrata è tale che non può a meno di provocare quà e là lacerazioni nelle pareti dei capillari. Ed infatti le emorragie capillari nelle sezioni di polmoni sono tutt'altro che rare. Non pochi sono gli alveoli che contengono sangue e insieme con esso, blastomiceti. Oltre a ciò, il polmone è il solo organo che presenti dei piccoli focolai parvicellulari in seno al tessuto interalveolare, focolai che portano nel loro (centro un numero vario -non mai molto cospicuo) di blastomiceti. I blastomiceti che si trovano in seno a questi focolai sono per lo più liberi, talora però sono inclusi entro leucociti di cui si riconoscono ancora i nuclei tinti fortemente in rosso, appiattiti e situati a ridosso del contorno del leucocita; talora sembra che più d'un leucocita abbia inglobato un solo blastomiceta, cosa che si sa verificarsi sempre di fronte a sostanze grossolanamente granulose, come anche di fronte a parassiti voluminosi, come sarebbero filamenti d'actinomyces.

Nel rene i blastomiceti sono pure soffermati nei capillari della sostanza corticale e nelle anse vascolari dei glomeruli. Non di rado però anche qui i capillari sono rotti e quindi negli interstizii intertubulari, o nelle capsule glomerulari si versano globuli rossi e blastomiceti.

L'emorragia può allora determinare disgregamento del tessuto)

ed allora, solo allora, può accadere d'incontrare qualche blastomiceta nell'interno dei tubuli uriniferi.

Ma senza emorragia e scompaginamento del tessuto non c'è passaggio di blastomiceti nelle vie urinifere e il fatto è rarissimo a verificarsi. Ciò malgrado, lesioni di tubuli contorti vi sono quasi sempre, per quanto disseminate e circoscritte. Ora, non potendosi supporre dovute al contatto coi blastomiceti che eventualmente avessero passato i glomeruli (inquantochè, ripetiamo, la presenza dei blastomiceti nei tubuli uriniferi è affatto eccezionale) tale lesione può essere spiegata dalla distruzione di elementi che è avvenuta nel sangue, ed ha messo così probabilmente in libertà dei materiali solubili capaci di filtrare attraverso gli epitelii del rene e, nel filtrare, di alterarli. Però lesioni polmonari, e lesioni renali non acquistano mai una importanza patologica notevole; sempre esse rimangono circoscritte, e non sono tali da turbare in misura importante la funzione dell'organo.

Nel fegato, nella milza, nelle capsule surrenali, nel midollo osseo non si rinvengono alterazioni notevoli ed il numero di blastomiceti che in essi si trova, e costantemente nei capillari, è ben scarso; senza paragone quindi inferiore a quelli che si trovano nei reni e nei polmoni. I blastomiceti non durano molto a scomparire dai visceri. Animali uccisi a 20 giorni dalla inoculazione mostrano le lesioni, quasi completamente riparate, nè più permettono di riconoscere la presenza di blastomiceti, neppure nei reni e nei polmoni.

I blastomiceti, quali si riconoscono in questi tessuti. intensamente colorati dal verde di malachite o dal liquido di Ehrlich, vengono rapidamente a presentare l'alone jalino, poco o nulla tingibile dalla sostanza colorante; facilmente essi sono raccolti in piccoli ammassi di 3, di 4 elementi circondati dall'alone che tende a confluire in una specie di unica capsula jalina.

Rapidamente pure essi sembrano diminuiti notevolmente di volume rispetto a quello ch'essi presentano in coltura, ma sarebbe difficile il dire quanto contribuiscano a ciò il metodo di fissazione e le varie manipolazioni a cui i pezzi e le sezioni sono sottoposte.

La vera via che li conduce a dissoluzione, parrebbe doversi seguir bene coll'esame a fresco, ma gli elementi sono così disseminati, che, non essendo soccorsi dalla colorazione differenziale, ne

riesce penosissima la ricerca; e dall'esame delle sezioni si può concludere solo al loro progressivo diradarsi, fino a scomparire completamente.

Riassumendo, l'inoculazione endovascolare del Saccharomyces apiculatus nel coniglio riesce innocua perchè il sangue ne annulla prima la vitalità, impedendone affatto la proliferazione, poi lo distrugge.

Questi fatti avvengono in parte nel grande torrente circolatorio tosto che i blastomiceti vi sono introdotti, in parte in disseminati territori capillari dove, e per il loro volume, e per il loro facile ammassarsi in seguito al rallentamento della corrente, quà e là si soffermano.

La loro fuoriuscita dai vasi, e conseguenti fenomeni reattivi è un fatto accidentale e d'indole puramente traumatica.

La perdita della loro attitudine a riprodursi è un fatto che succede rapidamente e che gli ha già colpiti quando si sono arrestati nei capillari, il che spiega come le colture dieno risultato negativo, mentre ancora perdura la loro presenza nei tessuti.

III.

Allorchè s'inoculi nel peritoneo di un coniglio un' abbondante coltura di saccharomyces apiculatus disciolto in qualche centimetro cubico d'acqua sterile. si verifica nelle prime ore un aumento di temperatura anche più leggero che quando l'inoculazione è endovascolare, non giungendo esso mai ad un centigrado. L'animale non dimostra alcun malessere, le funzioni si mantengono normali, l'orina non contiene albumina, l'animale non dimagra. Sopra dodici conigli così operati. uno solo dimostrò fenomeni morbosi importanti, che vanno considerati come eccezionali. Esso venne a morte dopo due mesi con segni di progressivo marasmo e presentò alla sezione una massa della grandezza di un ovo di piccione collocata fra le pagine dell'omento, e costituita da un materiale puriforme, corrispondente a ciò che Raum per primo descrive di aver ottenuto accidentalmente nel connettivo retroauricolare di un coniglio, che più tardi altri Autori osservarono in seguito all'inoculazione sottocutanea di blastomiceti, e che anche il Sanfelice ottenne nelle pecore col suo

saccharomyces lythogenes. Anche nel mio caso, il materiale cremoso non poteva considerarsi come vero pus, in quanto che i globuli bianchi che lo costituivano non contenevano i nuclei frammentati che sono per esso caratteristici; conteneva pure dei blastomiceti, riconoscibili per l'alone jalino che acquistano nel peritoneo. — A tutti gli elementi che costituiscono queste masse cremose, il Roncalli vorrebbe attribuire il significato di blastomiceti; ma per ciò che riguarda il mio caso, non potrei consentire.

È notevole che da questo materiale non ottenni sviluppo di coltura.

Di fronte a questo fatto, assolutamente eccezionale, ecco quali sono i fenomeni ch'io ho potuto ripetutamente constatare.

Se l'animale viene ucciso a distanza di ore o di giorni dall'inoculazione, il materiale introdotto nel peritoneo si presenta agglomerato in pochi grumi appoggiati all'omento, o tra le anse dell'intestino, o a ridosso del fegato e della milza. Nelle prime ore, i fenomeni reattivi consistono nella presenza di un liquido non molto abbondante, carico di leucociti, diffuso nel cavo peritoneale. Nei giorni seguenti, si sono formati scarsi filamenti di fibrina, tesi fra le anse dell'intestino e fra queste ed il peritoneo parietale; lungo i quali filamenti stanno, come altrettante nodosità più o meno voluminose, i grumi di blastomiceti. Non vidi mai fenomeni di peritonite generalizzata, mai iniezione viva delle anse, mai tendenza del liquido ad assumere aspetto purulento.

Siccome i blastomiceti presentano fin da principio delle modificazioni notevoli, io mi ero proposto di seguirle, passo a passo, nelle prime ore dall'inoculazione, con un mezzo semplicissimo, ricorrendo cioè al metodo adoperato da Pfeiffer, per la sierodiagnosi del cholera, della puntura capillare, ripetuta, del peritoneo. Ed infatti cominciando da un quarto d'ora dopo l'inoculazione, e ripetendo di quarto in quarto d'ora, penetravo nel peritoneo con un affilatissimo tubetto di vetro nel quale per capillarità saliva qualche goccia di liquido peritoneale che sottomettevo ad esame. Ma con mia grande sorpresa, queste goccie di liquido, mentre erano ricche di leucociti, erano invece fin da principio poverissime di blastomiceti e dopo un'ora ne erano affatto sprovviste. Anche a ventre aperto, goccie di liquido tratte dai più diversi punti del peritoneo,

trascorso quel breve periodo di tempo, non presentavano più forma alcuna di blastomiceta. Questi erano, sempre e tutti, raccolti in un numero assai limitato dei grumi anzidetti.

Una disseminazione degli elementi in varii punti del peritoneo rimaneva così assolutamente esclusa.

Ora, a determinare un tale fenomeno, partecipa indubbiamente, come fatto importante, il peso stesso dei blastomiceti, elementi voluminosi, che anche in una provetta di liquido, tendono a cadere al fondo, e che pure nel peritoneo, (vi sieno liberi od inclusi dai fagociti) devono tendere piuttosto a depositare, che a rimanere sospesi nel liquido effuso. Ma il fenomeno si verifica così rapidamente, ed in modo così complesso (come vedremo tosto) da ritenere che si aggiunga pure una vera azione agglutinatrice sulla massa inoculaata da parte delle sostanze con cui essa viene ben presto a contatto nel peritoneo.

Questo genere di azioni, studiate recentemente pel siero verso alcuni batterii, venne attribuito da taluno a proprietà degli umori, da altri a sostanze che deriverebbero loro esclusivamente dai leucociti; e questi, nel caso nostro, vi partecipano certo in modo cospicuo perchè è rapido il loro raccogliersi intorno ai blastomiceti, l'inglobarli in buona parte, e poi dissolversi.

Ma, quale si sia l'origine di tale fenomeno, spetta ad esso una parte non irrilevante nel meccanismo di protezione del peritoneo, imperocchè qualunque debba essere il successivo destino dei blastomiceti inoculati, certo è meno dannoso il loro raccogliersi in pochi gruppi che non il disseminarsi per tutta la sierosa.

Dacchè questi elementi sono così agglomerati, riuscirebbe difficile il credere ad un loro riassorbimento per via del sangue e dei linfatici. Ma ben questo potrebbe avvenire nei primissimi istanti dall'inoculazione; in quanto che è noto che iniettando sostanze corpuscolari nel peritoneo, si istituisce tosto una corrente linfatica, diretta verso il diaframma, e che il centro tendineo di questo costituisce la porzione assorbente della sierosa per le sostanze corpuscolari stesse le quali, o libere, o avvolte dai fagociti, vanno a soffermarsi nei gangli mediastinici. Non solo, ma secondo Dubar e Remy, le sostanze corpuscolari inoculate nel peritoneo, possono anche penetrare direttamente nel circolo sanguigno, per la via delle radicole

portali ; e Muscatello (1) il quale recentemente ha ripreso lo studio di questi fatti, ha dimostrato che i granuli di carminio, iniettati nel cavo addominale, dopo 5-10 minuti sono già nei gangli mediastinici, arrivativi direttamente attraverso le vie linfatiche del diaframma, e dopo 6 ore sono dimostrabili nei visceri, ivi giunti per la via del sangue.

Egli è perciò che io voluto praticare una ricerca metodica così del sangue che delle prime vie linfatiche. — Ho quindi eseguito gli stessi saggi del sangue, che praticai in seguito all'inoculazione endovascolare, istituendo colture ad una distanza di tempo varia da 15 minuti a 24 ore dall'introduzione del materiale. Le colture rimasero costantemente sterili.

Per ciò che riguarda le vie linfatiche, ho esaminato direttamente (un paio d'ore dopo l'inoculazione) il centro tendineo del diaframma, disteso sopra un vetrino portaoggetti, sia senza trattamento, sia trattandolo con una soluzione concentrata di potassa caustica, che ne rispetta solo la fibratura elastica, e rispetterebbe pure la struttura dei blastomiceti ove questi esistessero. Ho pure sezionato e trattato coi metodi specifici i gangli mediastinici.

Tali esami mi riuscirono completamente negativi ; così che ritengo di poter affermare, che i blastomiceti introdotti nel peritoneo, ivi tutti si soffermano, e là soltanto, si esercitano sopra di essi quelle azioni, con cui l'organismo se ne libera.

Ma quali sono queste azioni ? Abbiamo detto che i grumi peritoneali si mantengono per parecchi giorni ; anzi avviene che anche dopo parecchie settimane, ucciso l'animale, se ne trovi qualcheduno apposto o alle anse dell'intestino. o alla superficie del fegato, o della milza. Ma essi sono sempre più scarsi, e sempre più esili, fino a che scompaiono del tutto. Quali sono le modificazioni attraverso cui passano prima di scomparire, e da quali influenze determinate ?

Evidentemente una delle prime domande da porsi si era se la fagocitosi intervenisse in qualche modo, come meccanismo di difesa. Tutti quanti si sono occupati dello studio dei blastomiceti dal punto di vista sia sperimentale, sia puramente istologico, hanno notato la

(1). Muscatello, Sulla struttura e funzione di assorbimento del peritoneo. Arch. di scienze Mediche ; 1895 : fasc. 3.º

inclusione di parassiti entro elementi cellulari in genere, e leucociti in ispecie. Ma studi rivolti direttamente alla ricerca di tale fenoméno, non ne furon condotti. Solo per un'infezione affine, e cioè per l'actinomicosi, Pawlowsky e Maksutoff (1) hanno descritto con un certo dettaglio, la lotta che si impegna tra fagociti e filamenti del parassita.

Anche nei miei animali, fatti che dimostrino una importante compartecipazione dei fagociti nella difesa del peritoneo contro i blastomiceti, esistono indubbiamente. Dicemmo già che sin dai primi istanti si stabilisce una notevole immigrazione di leucociti nel cavo peritoneale. Questi non tardano ad aggredire ed inglobare elementi blastomicetici; ma di mano in mano che si caricano di questi voluminosi e relativamente pesanti elementi essi tendono a depositarsi, raccogliendosi in grumi, ed è perciò che la puntura capillare del peritoneo non ne dimostra che un numero estremamente scarso, e che lo studio del fenomeno non può farsi che a ventre aperto, dopo aver ucciso l'animale. Il momento più opportuno per ciò, si è a distanza di due o tre ore dall'inoculazione, in quanto che allora si possono cogliere varii stadi del fenomeno, nell'esaminare, schiacciato tra due vetrini, un solo e medesimo grumo. — Ma, anche schiacciando fortemente il preparato fra i due vetrini, solo lungo il contorno di esso si staccano e si rendono nettamente visibili gli elementi, mentre resta, come una massa fitta, quasi inscindibile, la parte centrale del grumo. Gli elementi marginali sono o blastomiceti liberi o fagociti ripieni di blastomiceti: vi sono cioè così leucociti che grandi cellule endoteliari, contenenti 3, 4, perfino 5 blastomiceti, di modo che questi riempiono completamente il fagocita nascondendone non di rado il nucleo o ricacciandolo verso il margine della cellula. Assai presto, si vede con frequenza formarsi nell'interno del fagocita degli spazii vacuolari, entro cui sta un singolo blastomiceta; e talora questi presentano già dopo sole tre o quattr'ore, un sottile alone jalino periferico. (v- fig. 7, 8).

La massa centrale del grumo è costituita da un viluppo di blastomiceti, i quali, attentamente osservati, appariscono cementati

(1) Pawlowsky e Maksutoff Sur la phagocytose dans l'actinomycose. Annali di Pasteur 1893 n. 7.

fra loro da una sostanza granulare che costituisce per così dire una glia destinata ad avvolgerli e a conglobarli. Evidentemente, questa sostanza granulare, non può aver che un'origine, e cioè non può esser altro che il prodotto di disfacimento dei fagociti stessi. Ciò risulta da due fatti: anzitutto da ciò che i fagociti con inclusioni, abbondanti ai margini del grumo, mancano nel centro; e che, facendo l'esame a distanza maggiore dall'inoculazione, fagociti non se ne vedono più, e tutti i blastomiceti sono avvolti in un detrito cellulare; in secondo luogo, dal modo di comportarsi di questo materiale verso le sostanze coloranti. Infatti, io ho fissato alcuni di questi grumi, raccolti 1 o 2 giorni dopo l'inoculazione, e trattate le sezioni coi metodi specifici. Colla colorazione suggerita da Ajevoli, (1), e che non è che una modificazione dei metodi di Sanfelice (trattando ciò successivamente le sezioni con liquido di Ehrlich, con soluzione di acido ossalico, con alcool fino a quasi completa decolorazione, e da ultimo con safranina) mentre i blastomiceti, abbondantissimi, restavano colorati in violetto, si riconosceva sostanza granulare, frammenti di nuclei, porzioni di elementi disciolti, che avevan tutti assunto la safranina. E qua e là, si potevano ancora riconoscere blastomiceti centrali, i quali erano tuttora avvolti da leggeri tratti di protoplasma safranofilo. Vi è dunque anche una ragione chimica per affermare che la glia di questi grumi è di origine leucocitaria, e che non potrebbe in alcun modo attribuirsi a materiale proveniente da blastomiceti stessi che fossero andati disciolti.

A questo punto, devo riferire come le colture istituite coi grumi peritoneali, abbiano dato risultato positivo sino a 24 ore dall'inoculazione dopo il quale periodo di tempo, saggi ripetuti più e più volte diedero esito costantemente negativo.

Lo svolgersi di questi fatti indica dunque in modo netto la parte che ha la fagocitosi nell'infezione peritoneale da me studiata, Non appena inoculata la massa di blastomiceti, si stabilisce nel peritoneo una leucocitosi notevolissima; microfagi e macrofagi si impadroniscono di blastomiceti, con ogni probabilità tuttora viventi;

(1) Ajevoli; Ricerche sui blastomiceti nei Neoplasmi (Cblatt. f. Bakteriologie 1896; XX, n. 20-21.

ma una volta impadronitisi di questi, nella lotta che si impegna tra elemento vincitore e elemento prigioniero, finisce col soccombere il primo, in quanto che finisce col dissolversi e costituire la glia che avvolge la massa di parassiti.

Nella lotta però, hanno danno gli uni e gli altri; i fagociti restano distrutti, ma ciò che ne rimane tiene avvinti, conglobati i parassiti, impediti perciò di disseminarsi nel peritoneo. L'arresto della loro vitalità può darsi che sia indipendente dall'inclusione subita, come diremo più tardi; ma ne dipende almeno in parte una serie di modificazioni che i blastomiceti vanno a subire ulteriormente.

Se il peritoneo viene aperto a parecchi giorni di distanza dall'inoculazione, i grumi più piccoli non si veggono più, i maggiori sono assotigliati, così che dopo alcune settimane tutto è scomparso. E se essi vengono esaminati ad intervalli diversi dall'inoculazione, si riconosce la via attraverso cui i btastomiceti giungono a distruzione.

Ho detto già che molto rapidamente i singoli blastomiceti tendono ad assumere l'alone jalino, che gli A. concordemente ammettono essere proprio dei blastomiceti che si sono fissati nei tessuti. E frattanto il protoplasma dell'elemento si è raccolto, formando una massa centrale, che occupa più o meno della totalità dell'elemento; e questa massa ha una tinta verdiccia più intensa dei blastomiceti in coltura, ed è granulosa.

Come il fenomeuo vada poi procedendo, vien detto, meglio che tutto, dal protocollo d'uno degli esperimenti ch'io trascrivo in parte:

« Coniglio 20°; inoculato nel peritoneo il giorno 18 Settembre, ucciso il g. 26 Sett.

Pochissima quantità di liquido nel cavo peritoneale. Qualche briglia fibrinosa. Due grumi piccolissimi, appoggiati alla superficie posteriore dello stomaco, imbrigliati in un debole reticolo fibrinoso. Un piccolo grumo appoggiato ad uno dei lobi del fegato.

L'esame dei visceri nulla rivela di notevole. Il liquido peritoneale libero non presenta che scarsissimi leucociti; qualche cellula endoteliale, qualche globulo rosso; tutti questi elementi sono però estremamente rari. Dal liquido e dai grumi si fanno colture che riescono sterili.

I grumetti, danno all'esame microscopico il seguente reperto: Essi sono costituiti da blastomiceti, raccolti in ammassi, non cementati che da scarsissima fibrina. Nessun blastomiceta ha conservato l'aspetto quale presentano in coltura. Tutti hanno assunto una forma tondeggiante, e tutti sono provveduti di un alone jalino, più o meno largo, che talora si presenta costituito da strati concentrici; la parte centrale dell'elemento è verdiccia e granulosa con contorno fortemente rifrangente. — Spesso i blastomiceti capsulati sono raccolti in gruppi di 4, 5 e più, e le capsule sembra tendano a fondersi in un'involucro comune.

Da questi blastomiceti si passa ad altri in cui l'alone è altrettanto perfettamente conservato, ma la parte centrale è tinta assai debolmente, e il contorno è divenuto assai meno rifrangente; poi da questi ad altri, in cui la parte centrale è ridotta piccola e quasi evanescente, residuando solo dei granuli, mentre l'alone jalino va facendosi sempre maggiore, fino a che si arriva ad altri in cui anche i granuli sono scomparsi e si vede un tutto jalino, trasparentissimo, che si direbbe in via di dissolversi completamente. »

Questa adunque è a mio avviso la via per cui i blastomiceti scompaiono dal peritoneo. — La natura delle trasformazioni ch'essi subiscono è certo diversa da un semplice invecchiamento, in quanto che esse presentano delle differenze da quanto si vede semplicemente in vecchie colture. Esse hanno di comune la prevalenza che prende la sostanza jalina, il raccogliersi al centro e farsi granulosa la sostanza più rifrangente; talora anche la forma quasi di alone che si verifica in molti elementi vecchi da coltura; ma in coltura, tutto ciò avviene all'interno della membrana rifrangente, mentre negli elementi del peritoneo l'alone jalino è esterno alla membrana stessa. E' così che, mentre le trasformazioni che subiscono gli elementi, invecchiando in coltura, dipendono sopratutto da un modo vario di disporsi delle due sostanze: jalina e rifrangente che costituiscono anche l'elemento giovane, e dal finir poi col prevalere l'una sull'altra, invece l'alone jalino che i blastomiceti assumono nell'organismo viene considerato dal Sanfelice come una produzione esterna della membrana rifrangente del blastomiceta.

Checchè ne sia di ciò, mi parrebbe di poter affermare che una

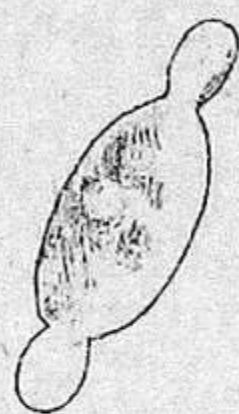
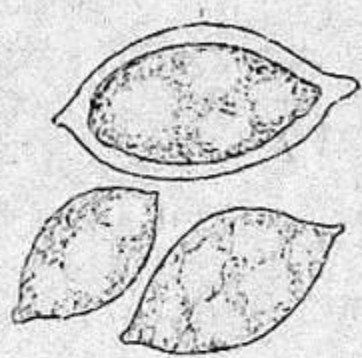
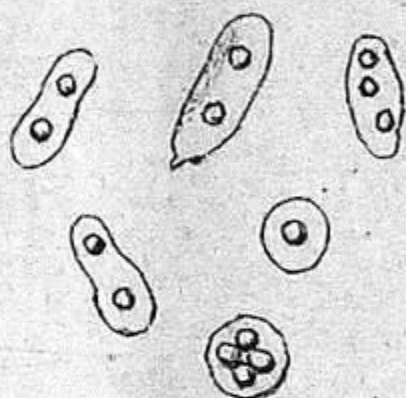
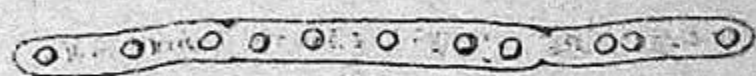
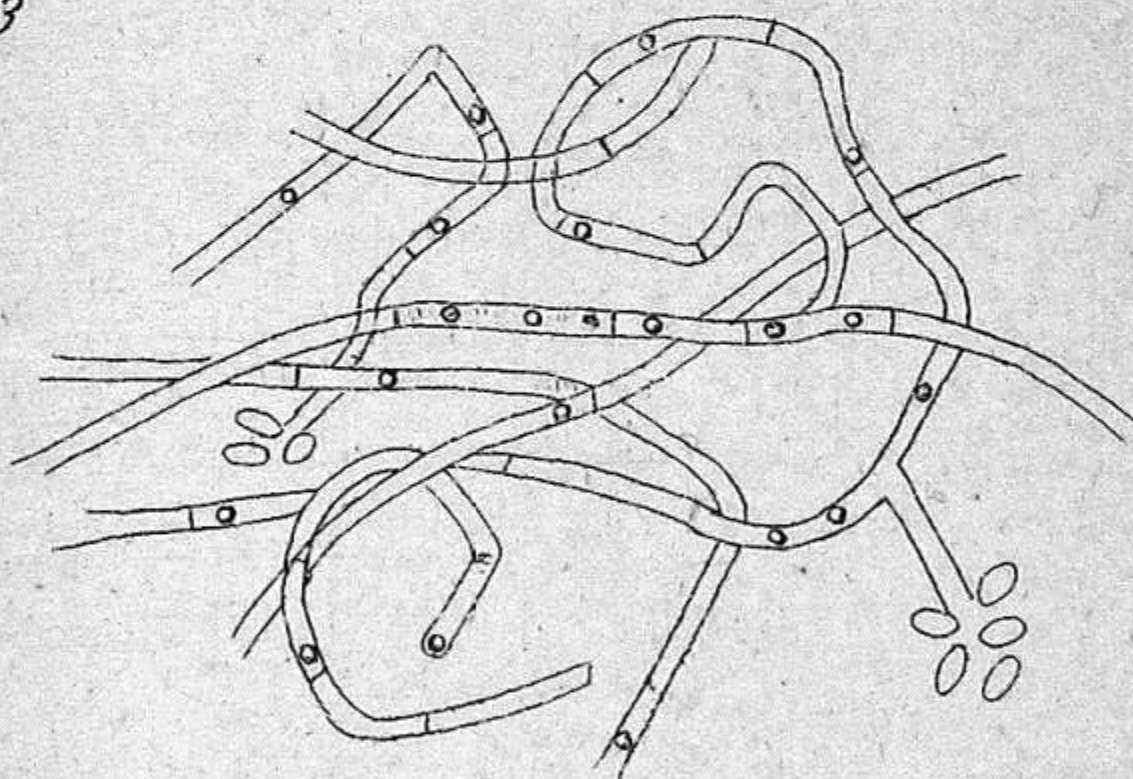
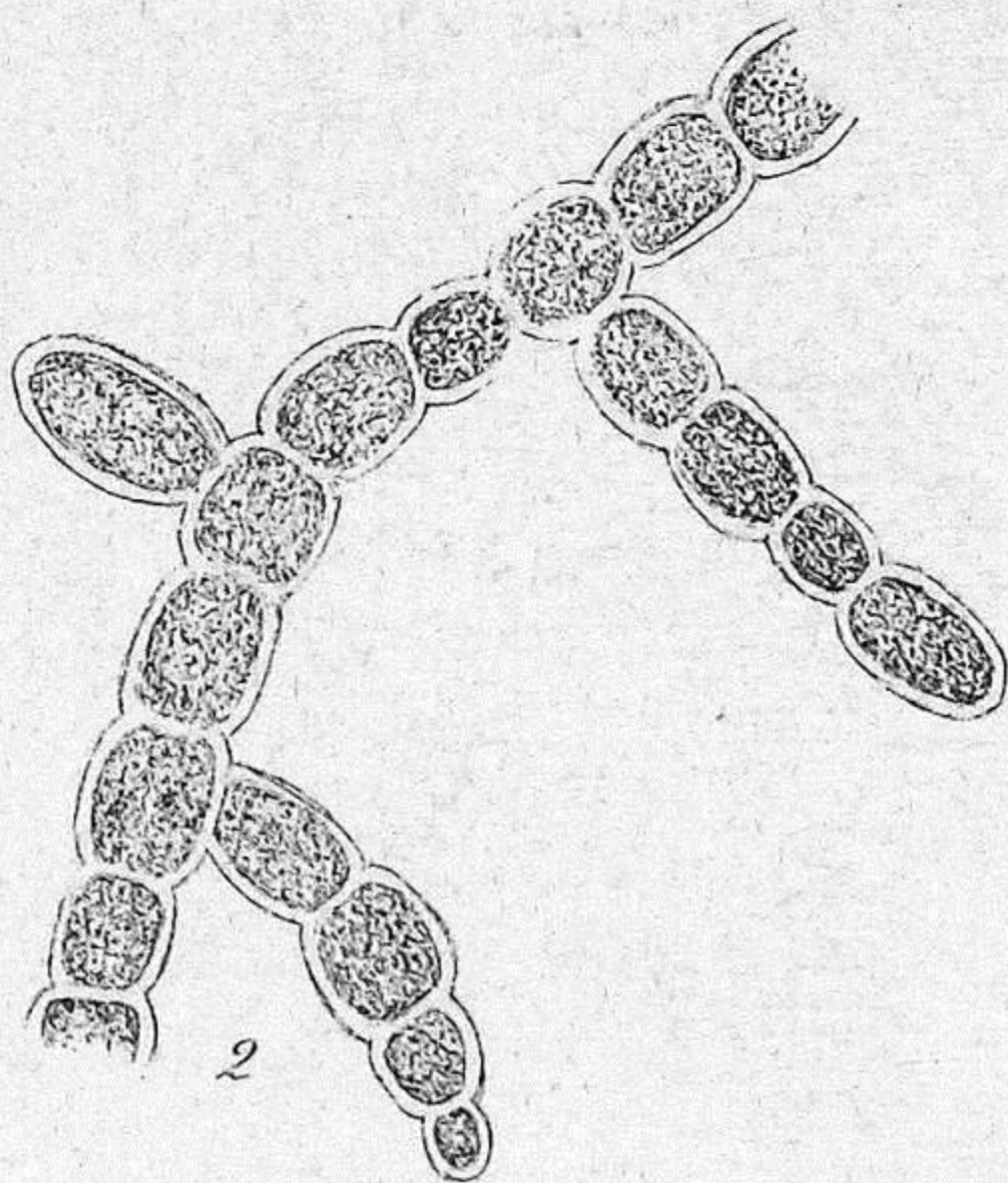
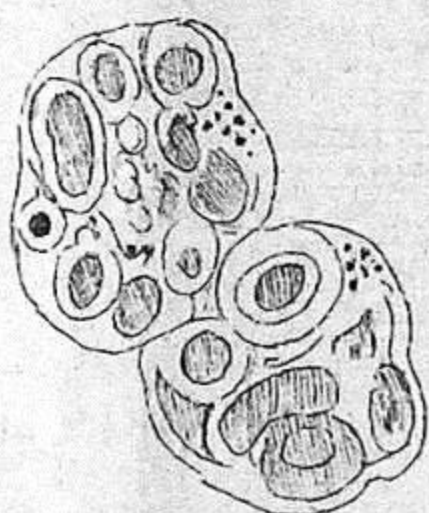
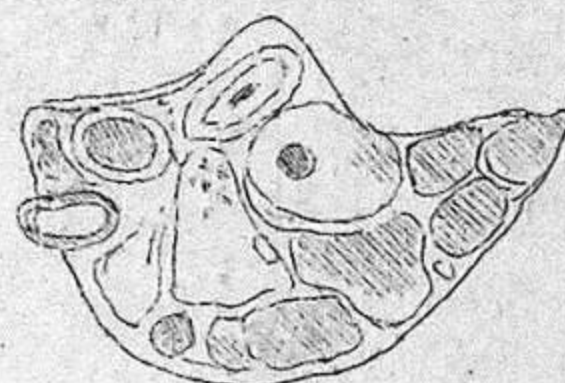
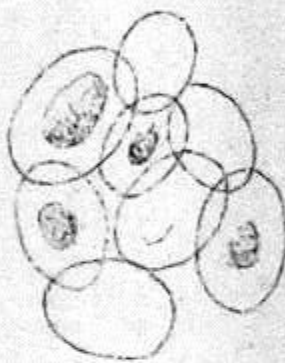
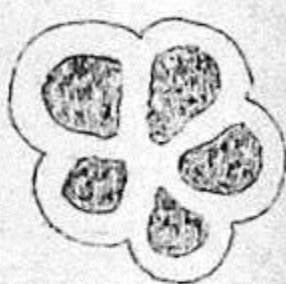
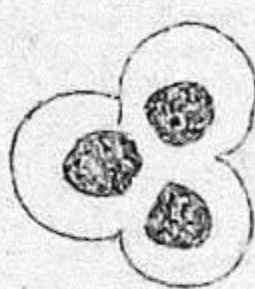
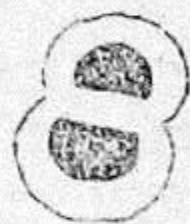
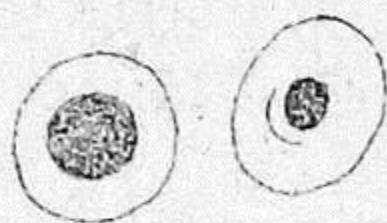
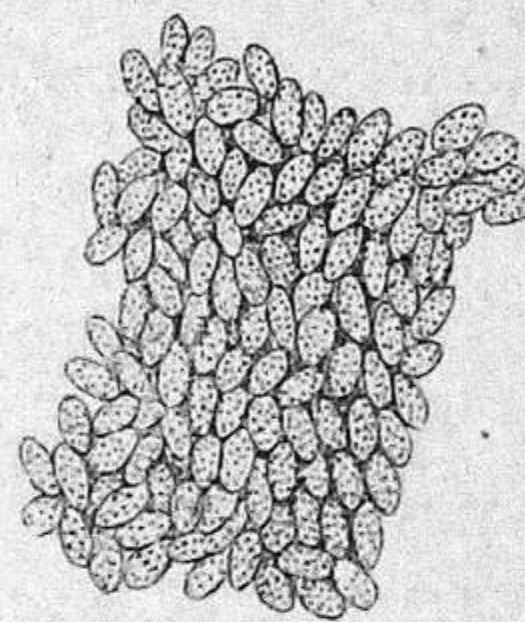
grande importanza nell'impartire questo aspetto ai blastomiceti, spetta all'inclusione ch'essi hanno subito nei fagociti.

A questo pensiero mi induce, l'esperimento diretto da me fatto di sottrarre i blastomiceti all'azione dei fagociti, pur lasciandoli a contatto col liquido peritoneale. Per riuscire a ciò, ho adoperato delle cellette di celoidina, la quale come è noto è dotata della proprietà (già utilizzata da molti altri allo stesso scopo) di lasciarsi attraversare dagli umori dell'organismo e non dai fagociti. Perciò riempivo una di queste cellette di qualche goccia di coltura in brodo di blastomiceta, chiudendo accuratamente l'apertura con qualche goccia di celoidina, e la introducevo, con tutte le norme asettiche, nel cavo peritoneale. Dopo un numero vario di giorni lo estraevo; ma sebbene io abbia fatto l'esame anche a **10**, **12** giorni dall'introduzione, non potei mai verificare modificazioni eguali a quelle che i blastomiceti subiscono quando sono liberi nel peritoneo. Basta gettare uno sguardo alle figure **10** e **11** per riconoscere le differenze. La fig. **11** che rappresenta blastomiceti tratti da una di queste cellette sette giorni dopo l'introduzione, dimostra conservata la forma ovale dell'elemento, ma questo rimpiccolito, atrofizzato, rappresentante per così dire l'elemento normale in miniatura. Ed il sottile alone che si verifica in quasi tutti, corrisponde per il suo aspetto e la sua sede a ciò che presentano spesso i blastomiceti nelle vecchie colture. Rimpiccolito l'elemento, quì pure il protoplasma rifrangente finisce col ridursi a pochi granuli, il contorno esterno diventa evanescente, e l'elemento scompare. La via dunque è diversa, ma il risultato ultimo è il medesimo; ed il fatto prova che le azioni che si esercitano sui blastomiceti, sono complesse derivanti in parte dalle proprietà degli umori, in parte da quelle dei fagociti.

Non solo, ma anche le condizioni fisiche, specialmente di temperatura, che trovano nel peritoneo, influiscono a toglier loro la proprietà riproduttrice che, al di là di **24** ore, dimostrammo distrutta. Essi trovano una temperatura poco al disotto dei **40** gradi che già *in vitro* arresta lo sviluppo di questo saccharomyces; ed infatti avendo introdotto in peritoneo dei tubetti di vetro, contenenti qualche goccia di coltura, e chiusi alla lampada, con un dardo sottile di fiamma, dopo un paio di giorni non era più possibile ottenere da quel materiale, sviluppo di coltura.

Cosicchè, i fatti da me descritti in quest'ultima parte del lavoro, possono brevemente riassumersi nelle seguenti proposizioni:

I blastomiceti inclusi nel peritoneo, vengono in buona parte inclusi nei leucociti o nelle cellule endoteliari; questi fagociti finiscono col dissolversi, ma frattanto i blastomiceti subiscono una azione agglutinatrice per cui vengono a radunarsi in pochi grumi, che poggiano sugli organi intraperitoneali; ed entro a questi grumi subiscono una serie di modificazioni per cui in poche settimane svaniscono. Queste modificazioni sono dovute a più cause, che tutte concorrono a distruggere la vitalità dell'elemento, e sono rappresentate dalle condizioni fisiche dell'ambiente, dall'azione degli umori, e da quella dei leucociti.

Novembre 1896

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

(*semischematica*)

Fig. 1. sacch. apiculatus (da coltura in agar) Koriska, *ocul. 4 ob. 9.**

» 2. serie di elementi da colonia frangiata (da piastra in agar) *ocul. 4 ob. 9.**

» 3, 4 5 forme di oïdium da colt. ottenuta dal sangue circolante, otto ore dopo l'inoculazione *ocul. 4 ob. 9.**

« 6. micelii da trapianti della coltura precedente *ocul. 4 ob. 9.**

» 7. 8. Leucociti, cellula endoteliare con inclusione di blastomiceti (dal peritoneo, due ore dopo l'inoculazione) *ocul. 4 ob. 9.**

» 9. porzione centrale di un grumo peritoneale due ore dopo l'inoculazione; *ocul. 3 ob. 7.*

» 10. blastomiceti dal peritoneo, otto giorni dopo l'inoculazione *ocul. 4 ob. 9.*

« 11. blastomiceti tratti da celletta di celoidina, sei giorni dopo introdotta nel peritoneo *ocul. 4 ob. 9.**)